



TITLE:

ABCA1の機能を制御するC末端領域  
内のアミノ酸配列モチーフの同定(  
Abstract\_要旨)

AUTHOR(S):

岡本, 雄介

---

CITATION:

岡本, 雄介. ABCA1の機能を制御するC末端領域内のアミノ酸配列モチーフの同定. 京都大学, 2020, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22506>

RIGHT:

( 続紙 1 )

京都大学	博士（農学）	氏名	岡本 雄介
論文題目	ABCA1の機能を制御するC末端領域内のアミノ酸配列モチーフの同定		
(論文内容の要旨)			
<p>ATP binding cassette A1 (ABCA1)は血中の高密度リポタンパク質(HDL)が顕著に減少する遺伝病であるTangier病の原因遺伝子として1999年に同定された。それ以来、ABCA1の生理的な機能は過剰なコレステロールを細胞外に排出してコレステロール恒常性を保つことであるとされてきた。しかし最近の研究から、ABCA1は、コレステロールを細胞外に排出するだけでなく、細胞膜脂質二重層の内層から外層に移動させるコレステロールフロップ活性を持ち、内層のコレステロール濃度を低く保つことで細胞内へのシグナル伝達や細胞内のコレステロール量の調節に重要な役割を果たしていることが示唆されている。このようにABCA1がコレステロール排出とコレステロールフロップという2つの活性をもつことが明らかとなりつつあるが、ABCA1のこれら2つの活性の間にどのような関係があるかは不明であった。本研究では、ABCA1の2つの活性に着目し、機能未知のC末端領域を解析した。その結果、ABCA1の機能に重要な2種類のアミノ酸配列モチーフを見出し、ABCA1のコレステロール排出活性とフロップ活性は異なる構造基盤に支持される活性であることを明らかとした。</p> <p>ABCA1が属するABCタンパク質ファミリーは生物界で最も大きなタンパク質スーパーファミリーのひとつであり、そのメンバーのほとんどは膜輸送体として機能し、ATPの結合と加水分解に伴う構造変化によって様々な基質を脂質二重層の内外に能動的に輸送する。ヒトでは48の遺伝子が同定されており、ATP結合部位のアミノ酸配列の相同性に基づいてA~Gの7つのサブファミリーに分類される。ABCA1が属するABCAサブファミリーは12のメンバーで構成されており、他のサブファミリーには存在しない特徴的なC末端領域を持つ。C末端領域のアミノ酸配列はABCAサブファミリー全体にわたりよく保存されている。ABCA1のC末端領域の機能を解析するため、本研究ではABCA1のC末端領域を他の11のABCAサブファミリーメンバーのC末端領域と入れ替えたキメラタンパク質を作製し、その活性を解析した。最初に、ウエスタンブロッティングとフローサイトメトリー解析によって、HEK293細胞での一過的発現系において、作製したすべてのキメラタンパク質が予想されるサイズで発現し、細胞膜上に局在していることを確認した。続いて<sup>3</sup>H-コレステロールを用いたトレーサー実験により、キメラタンパク質のHDL産生活性すなわちコレステロール排出活性を解析した。その結果、11のABCA1キメラタンパク質の内、ABCA2、ABCA3、ABCA4、ABCA12、ABCA13のC末端領域と入れ替えた5つのキメラタンパク質のみがコレステロール排出活性を示し、その他6つのキメラタンパク質は活性を示さなかった。次に、コレステロール結合性細菌毒素を利用したコレステロール認識プローブを用いた解析により、キメラタンパク質のコレステロールフロップ活性を調べた。その結果、コレステロール排出活性を示さなかった6つのキメラタンパク質は、コレステロールフロップ活性も示さないことがわかった。一方で興味深いことに、コレステロール排出活性を示した5つのキメラタンパク質の内、コレステロールフロップ活性も示した</p>			

のはABCA4とABCA13のC末端領域と入れ替えたキメラタンパク質のみであった。これらの結果から、C末端領域内にはABCA1の2つの活性に重要なアミノ酸配列モチーフが存在することが予想された。

ABCAサブファミリーのC末端領域のアミノ酸配列を比較したところ、コレステロール排出活性を示した5つのキメラタンパク質がもつABCAサブファミリーメンバーのC末端領域では、VFVNFAの6つのアミノ酸残基がよく保存されていた。一方で、キメラタンパク質がどちらの活性も示さなかったその他6つのABCAサブファミリーメンバーでは、VFVNFAの保存性が低かった。このことから、VFVNFAモチーフがコレステロール排出とフロップの2つの活性に必須であることが示唆された。そこで、ABCA1のC末端からVFVNFAの手前までの40アミノ酸残基を欠損させた $\Delta 40$ 、VFVNFAモチーフごと欠損させた $\Delta 46$ 、VFVNFAをすべてアラニンに置換した6Aの3つの変異体を作製し、それらの活性を解析した。その結果、VFVNFAモチーフを保持する $\Delta 40$ 変異体はコレステロール排出、フロップ活性を共に示したのに対し、このモチーフを欠損または置換した $\Delta 46$ 変異体と6A変異体では2つの活性が大きく低下していた。この結果から、VFVNFAモチーフがABCA1の2つの活性に必要であることが明らかとなった。

ABCA1はATP加水分解に伴う構造変化を利用してコレステロールを排出またはフロップする。そこで精製ABCA1を人工脂質二重膜であるリポソームに再構成した系を用いて、VFVNFAモチーフ変異体のATP加水分解活性を解析した。その結果、VFVNFAモチーフを欠損した $\Delta 46$ 変異体はATP加水分解活性を失うことがわかり、VFVNFAモチーフがABCA1のATP加水分解に必要であることが明らかとなった。

ABCA1のC末端領域には、ロイシンジッパー様の特徴を示す3つのロイシン残基が存在する。ABCAサブファミリーメンバーのC末端領域のアミノ酸配列を比較したところ、キメラタンパク質がコレステロール排出とフロップ活性の両方の活性を示したABCA4とABCA13のC末端領域では、このロイシンジッパー様モチーフ内の3つのロイシン残基がよく保存されていた。一方で、キメラタンパク質がコレステロールフロップ活性を示さなかったその他のABCAサブファミリーメンバーでは、これら3つのロイシン残基の保存性が低かった。そこで、これら3つのロイシン残基をアラニンに置換した3LA変異体を作製し、その活性を検討した。その結果、3LA変異体はコレステロール排出活性を正常に示すにもかかわらず、コレステロールフロップ活性を失うことがわかった。これらの結果から、ABCA1のロイシンジッパー様モチーフは、コレステロール排出活性には必要ないが、コレステロールフロップ活性に必要であることが明らかとなった。また、本研究において、コレステロール排出活性を保持するにも関わらず、フロップ活性のみを失う変異体が見出されたことから、ABCA1のコレステロール排出とフロップの2つの活性は異なる構造基盤に支持される活性であり、それぞれが独立に制御される可能性が示唆された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

ABCA1はコレステロールを細胞外に排出する活性と、コレステロールを細胞膜の内層から外層に移動させるフロップ活性という2つの活性を有している。ABCA1がこれら2つの活性を発揮し、細胞内のコレステロール量や分布を調節することが、細胞のコレステロール恒常性やシグナル伝達の調節に重要な役割を果たすことが明らかとなりつつある。しかし、ABCA1の2つ活性の関係性は明らかとなっていなかった。本論文は、ABCA1の2つの活性に着目し、機能未知であったC末端領域を解析したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. C末端領域内のVFVNFAモチーフは、ABCA1のコレステロール排出活性、コレステロールフロップ活性、ATP加水分解活性に必要であることを明らかにした。
2. C末端領域内のロイシンジッパー様モチーフは、コレステロール排出活性には必要ないが、コレステロールフロップ活性には必要であることを明らかにした。
3. ABCA1の2つの活性は異なる構造基盤に支持される活性であり、C末端領域によって2つの活性が独立に制御されている可能性を示した。

以上のように、本論文はABCA1のコレステロール排出とコレステロールフロップの2つの活性が互いに異なることを明らかにし、これら2つの活性の生理的意義と制御機構を解明するうえで重要な知見を与えたものであり、分子細胞生物学、細胞生化学および基礎生理学の発展に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和 2 年 2 月 7 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）